第1卷第1期　　动物学研究　　Vol. 1, No. 1
1980年2月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Feb., 1980

小鼠腹水型肝癌的核型分析

刘瑞清　郭健民　张耀平　丁玲华

（中国科学院昆明动物研究所）

摘　　要

本文以几种分带Giemsa染色技术和Ag—As染色，分析小鼠腹水肝癌的核型。结果表明，小鼠腹水肝癌是一种近二倍体肿瘤，染色体众数为42—43，有标记染色体4—5条。2—3条染色体带有银染色阳性的核仁组织者，后者常出现在M1和M3两条标记染色体的次缢痕部位。

小鼠肝细胞癌(实体型)(Hepatoma22．简称H22)，是1952年苏联医学科学院肿瘤研究所，用邻氨基氮甲苯(O．A．A．T)诱发的肝肿瘤。1959年引入我国医学科学院肿瘤研究所。本文研究的是由H22实体瘤转变而来的小鼠腹水型肝癌(Mouse Ascites Hepatoma, 简称MAH)。本文应用T—G带，C—带和Ag—AS染色技术对MAH的核型和核仁组织者（NOR_s）的分布等进行了分析研究。

材料与方法

一、染色体标本的制备

瘤株引自中国医学科学院四川分院，以本所饲养的小鼠移植传代。

接种后第六天，按7毫克/公斤体重的剂量，在小鼠腹腔内注入0.1%秋水仙素，两小时后，抽取腹水0.2毫升，0.5% KCl低渗，甲醇—冰醋酸固定，空气干燥法制片，Giemsa染色。

二、染色体分带技术

胰酶—Giemsa带(G—带）技术参照中国医学科学院肿瘤研究所细胞生物组(1976)[1]方法。染色体标本用0.03%胰酶（1:250 Difco）处理5分钟（28°C），生理盐水冲洗，蒸馏水冲洗，Giemsa染色（pH6.81）。

着丝点异染色质带（C—带）参考Arrighi和Hsu（1971）[2]方法稍加修改。片子年龄约三天左右的染色体片，用0.2*N* HCl(22°C)处理30分钟，0.035*N* NaOH(22°C)处理约3秒钟，乙醇干燥，2×SSC(65°C)孵育16小时，乙醇干燥，Giemsa染色(pH6.81)。

本文于1979年11月27日收到。
本文承我所施立明同志修改，特此致谢。

三、银染色(Ag—AS)按Goodpasture等(1975)[3]和施立明等 (1979)[4]方法进行。配制三种溶液：（1）50%AgNo₃溶液，（2）氨银液（pH12—13），（3）3%的中性福尔马林用甲酸调pH至5—6。染色程序：在染色体片上滴加50%AgNo₃溶液4滴，复盖一张擦镜纸，置于潮湿的培养皿中，孵育12小时（65°C）。然后取出用自来水冲洗，空气干燥，滴加4滴3%的福尔马林，4滴氨银液，加盖玻片，显微镜下监视，当染色体呈现淡棕黄色，核仁组织者呈现黑色时，立刻用自来水冲洗，凉干。

结　果

一、染色体数目和形态

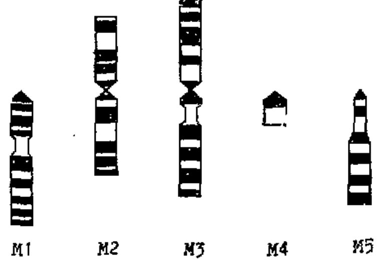
200个小鼠腹水肝癌（MAH）中期细胞的分析数据汇列于表。这是一种近二倍体癌细胞，染色体数目变化范围较大，但多数为40—44条（65.0%）。众数为42—43（13.0—32.0%），其中包括4—5条标记染色体即M1—M5（见照片1）。具有M1—M4标记染色体组合的细胞大约占46.0%，属于干系；具有M1—M5标记染色体组合的细胞大约占19.5%，属于亚系。

MAH核型中有38条近端着丝点染色体。标记染色体的形态特征是：M1是有次缢痕的近端着丝点染色体；M2是中间着丝点染色体；M3是紧靠着丝点有次缢痕的中间着丝点染色体。这是核型中最长的一条染色体；M4是微小染色体；M5是一条象"长颈瓶"的近端着丝点染色体。

二、标记染色体带型分析

1、胰酶—Giemsa（T—G）带

MAH细胞的G—带见照片2。标记染色体G—带模式图（图Ⅰ）是观察10个MAH细胞绘制的。



图Ⅰ 小鼠腹水肝癌标记染色体G—带模式图。

Fig.I. Idiogram illustrating G-banding of the mouse ascites hepatoma.

M1：着丝点区显示深带。从着丝点至次缢痕有三条深带三条浅带；从次缢痕至远端有五条深带四条浅带。

M2：着丝点中央区域有一条狭窄的浅染色的间隙。短臂上从着丝点至远端有四条深带四条浅带；长臂上从着丝点至远端有五条深带四条浅带。

M3：着丝点区域显示深带。短臂上从着丝点至远端有四条深带四条浅带；长臂上从次缢痕至远端有四条深带三条浅带。

M4：从着丝点至远端有一条深带和一条浅带。

M5：着丝点区显示深带。从着丝点至远端有五条深带和五条浅带。

2、着丝点异染色质带（C—带）

MAH细胞中43条染色体的着丝点全部显示异染色质（照片3）。M3靠近着丝点次缢痕的异染色质区与着丝点的异染色质区看来好像连接成一片，显示出一大块深暗的异染色质区。M2着丝点区域中央有一条非常清楚的淡染色间隙。M5的"长颈瓶"全部显示很深的异染色质

3、Ag—NOR的分布

经Ag—AS染色，有两条染色体（M1和M3）带有Ag—NOR，个别细胞出现三条（M1．M3和a）（见照片4）。M1和M3的Ag—NOR都出现在次缢痕部位。前者呈现为一对并列的小园形黑点，后者为大块的长形黑斑。a是近端着丝点染色体。在着丝点下方并列一对小园黑点，显色稍浅，在多数细胞中并不显示。

讨　论

不同的致癌剂诱发小鼠腹水肝癌的核型不同。MAH细胞核型与Yosida等（1966）[5]报导的美国Andervont实验室用四氯化碳诱发的小鼠腹水型肝癌（MH—134和MH—129P）的核型差异较大。特别是在不同地区，长期移植传代后，这种瘤系又分化成近二倍体细胞的四个亚系。亚系的核型与早期干系的核型很不一致。虽然MAH的核型与这四个亚系的核型都属于近二倍体肿瘤，但它们的染色体数目，标记染色体形态等都显然不一样。尤其是MAH核型中有一条带次缢痕的近端着丝点染色体（M1）和一条"长颈瓶"染色体（M5）是前述亚系中没有的。这说明不同的化学致癌剂，可能通过不同途径诱发不同核型的小鼠腹水肝肿瘤。Yosida (1966)[5]认为MH—134A等四个瘤亚系核型的差异是由于在不同的地区，经长期移植传代，核型发生变异，选择而进化的结果。

M2的T—G带显示在着丝点区域有两条靠近的深带，中间是一条狭窄的淡染色间隙（照片2）；C—带染色显示有两个靠近的异染色质带，其中间是淡染色间隙（照片3）。因此，M2染色体可能是双着丝点的结构。可能这是两条近端着丝点染色体发生非对称性易位，通过Robertsonian融合的结果。在有丝分裂中，这两个彼此非常靠近的着丝点实际上只起一个着丝点的作用[6]，或者其中一个着丝点"失活"，成为潜在性的着丝点，而另一个着丝点保持功能[7]。所以这条双着丝点染色体就能稳定地传递。MAH细胞中的M2同亚四倍体细胞小鼠腹水瘤180（S180）[8,9]和几种超二倍体细胞小鼠腹水瘤（ELD，L1和S180等）[10]一样，是一条稳定传递的双着丝点染色体。

正常小鼠细胞（2n＝40）的Ag—NOR有3—6个，位于№15，19和18染色体着丝点下方[3,4,11]。我们的结果表明小鼠骨髓细胞有5个Ag—NOR（照片5）。Henderson等（1974）[12]的原位分子杂交实验，证明了小鼠正常细胞的18S＋28S rDNA与小鼠细胞的Ag—NOR的位置一致。MAH细胞的M1和M3次缢痕区域显示Ag—NOR，明显与正常小鼠的分布不一样。另一条近端着丝点染色体的NOR位置和正常细胞的相似，分布于着丝点下方，但出现频率较低。

肿瘤细胞的一个特征是蛋白质合成和细胞质嗜碱性增强，核仁变大。Miller等(1979)[13]以原位分子杂交技术证明大鼠肝癌（H4-IIE-C3 hepatoma）细胞的$18S+28S_rRNA$的密码基因增加近10倍。MAH细胞中的M1，特别是M3的次缢痕区域显示醒目的大块黑斑即Ag—NOR_s，要比正常细胞的大得多。这可能说明MAH细胞在癌变过程中$18S+28S_rRNA$的密码基因显著增加。

一些哺乳动物(Hsu等，1976)[14]，小鼠肿瘤(施立明等，1979)[4]和大鼠肿瘤(Miller等，1979)[13]等细胞中都可以看出次缢痕＝NOR_s＝$_r$DNA，但有例外。MAH细胞中也是次缢痕＝NOR_s＝$_r$DNA。

小　　结

小鼠腹水型肝癌（MAH）是一种近二倍体细胞，染色体众数为42—43，包括4条标记染色体（M1—M4）的细胞核型属于干系；包括5条标记染色体（M1—M5）的细胞核型属于亚系。

MAH细胞中的标记染色体M2是一条稳定传递的双着丝点染色体。

小鼠腹水型肝癌细胞中有2—3条染色体带有Ag—NOR_s，即$18S+28S_rDNA$。M1和M3标记染色体次缢痕是Ag—NOR_s的分布区。

表：小鼠腹水肝癌染色体数目分布和有标记染色体的细胞频率

Table. Distribution of chromosome numbers and frequency cells with marker chromosomes in the mouse ascites hepatoma.

染色体数目 / 标记染色体	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	其它	观察细胞数目	百分数(%)
M1 M2 M4													1	1	0.5
M2 M3 M4	1					2	2		1				1	7	3.5
M1 M2 M3 M4		2	4	8	8	18	44	6		1		1		92	46.0
M1 M2 2M3 M4													2	2	1.0
M1 2M2 M3 M4					1								2	3	1.5
M1 M2 M3 M4 M5			1	2	4	6	15	8	1				2	39	19.5
M1 M2 M3 2M4 M5							2		1				2	5	2.5
其它				1	1		1	1	2	1	1		43	51	25.5
总计	1	2	5	11	14	26	64	15	5	2	1	1	53	200	100.0

M1＝具有次缢痕的近端着丝点染色体；　M1＝acrocentric with secondary constriction.
M2＝中间着丝点染色体；　M2＝metacentric.
M3＝具有次缢痕的中间着丝点染色体；　M3＝metacentric with secondary constriction.
M4＝微小染体色；　M4＝minute.
M5＝"长颈并"的近端着丝点染色体，　M5＝flask-like acrocentric,

参 考 文 献

1. 中国医学科学院肿瘤研究所细胞生物组，1976，正常人体细胞的染色体分带。遗传学报，3（2）：150—155。

2. Arrighi F. E. et al., 1971. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics*, **10**: 81—86.

3. Goodpasture, C. et al., 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* (Berl.), **53**: 37—50.

4. 施立明等，1979、小鼠肿瘤细胞染色体核仁组织者（NORs）的细胞化学观察。科学通报，24（2）：93—96。

5. Yosida, T. H. et al., 1966. Chromosomal alteration and the development of tumors. XII. Differentiation of karyotype in mouse hepatomas MH-134 and MH-129p maintainde in different locations. *Gann*, **57**, 9—17.

6. Lau, Y. F. et al., 1977. Variable modes of Robertsonian fusions. *Cytogenet. Cell Genet*. **19**, 231—235.

7. Hsu, T. C. et al., 1975. The possibility of latent centromeres and a proposed nomenclature system for total chromosome and whole arm translocations. *Cytogenet. Cell Genet*. **15**, 41—49.

8. Chakrabarti, S. et al., 1977. Robertsonian fusion leading to the formation of stable dicentric chromosome in an ascites cell line of the mouse *Experientia*, **33**, 1296—1297.

9. Chakrabarti, S. et al., 1978. Stable and transmissible dicentric chromosome with terminal centromeres in ascites cells of mouse sarcoma 180. *Experientia*, **34**: 1271—1273.

10. 郭健民等，1979，几种小鼠腹水型肿瘤稳定性双着丝点染色体的发现。自然杂志，2（7）：409—410。

11. Hofgartuer, F. J. et al., 1979. Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver-staining. *Chromosoma* (Berl.), **71**: 197—216.

12. Henderson, A. S. et al., 1974. The chromosomal location of ribosomal DNA in the mouse. Chromosoma (Berl.), **49**, 155—160.

13. Miller, O. J. et al., 1979. Marked increase in ribosomal RNA gene multiplicity in a rat hepatoma cell line. *Chromosoma* (Berl.), **71**, 183—195.

14. Hsu, T. C. et al., 1975. Distribution of 18s+28s ribosomal genes in mammalian genomes, *Chromosoma* (Berl.), **53**, 25—36,

Karyotype Analysis of The Mouse Ascites Hepatoma

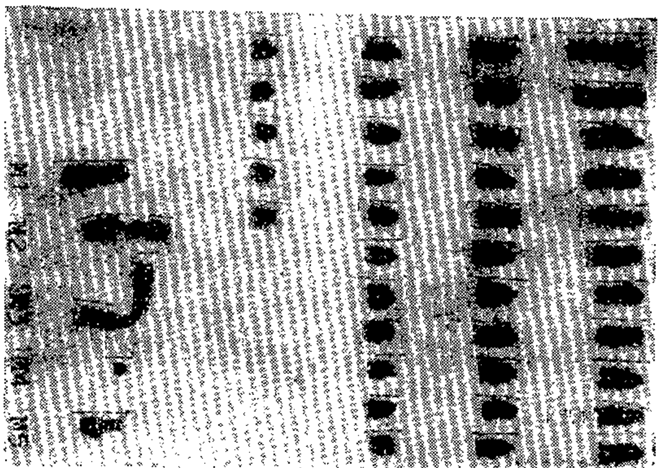
Liu Rui-qing Guo Jian-min Zhang Yao-ping Din Lin-hua

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Abstract

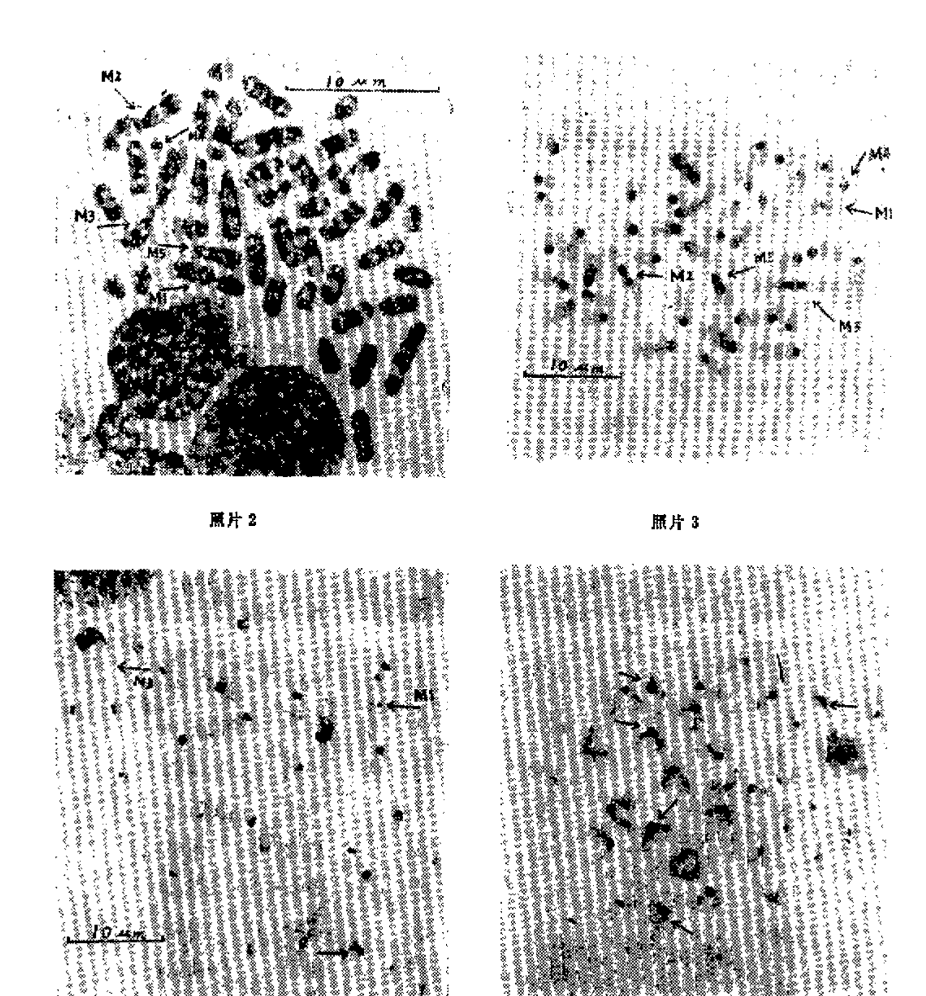
In the present paper, karyotype of the mouse ascites hepatoma is analysed with several banding techniques. The results show that the mouse ascites hepatoma is near-diploid with a modal number of 42—43 (13.0—32.0%) and four or five marker chromosomes. By Ag-AS procedure, silver stained NORs (Ag-NORs) are visualized as black spherical bodies on 2—3 chromosomes in the karyotype of the mouse ascites hepatoma. Ag-NORs in this mouse ascites hepatoma cell are usually seen to occur at secondary constrictions on the M1 and M3 chromosomes.





照片1. 小鼠腹水肝癌核型。染色体众数为43; M1——M5是标记染色体。

Fig.1. Karyotype in the mouse ascites hepatoma. Modal number of chromosome is 43. M1—M5 are markers,



照片 2

照片 3

照片 4

照片 5

照片 2 小鼠腹水肝癌的G—带. 染色体众数为43; M1—M5是标记染色体。

照片 3 小鼠腹水肝癌的C—带. 染色体众数为43; M1—M5是标记染色体。

照片 4 小鼠腹水肝癌的核仁组织者的Ag—AS染色。中期细胞表示 3 个Ag—NORs（箭头指处）.

照片 5 正常小鼠(*Mus musculus*)骨髓细胞核仁组织者Ag—AS染色。中期细胞表示 5 个Ag—NORs（箭头指处）.

Fig.2. G-banding patterns of the mouse ascites nepatoma. Modal number of chromosome is 42. M1—M5 are markers.

Fig.3. C-bands of the mouse ascites hepatoma. Modal number of chromosome is 43.M1—M5 are markers.

Fie.4. Ag-AS stained NORs of the mouse ascites hepatoma. Part of metaphase plate showing 3 chromosome with Ag-NORs (arrows).

Fig.5. Ag-AS stained NORs of the mouse (*Mus musculus*). Metaphase plate showing 5 chromosomes with Ag-NORs (arrrows).